

## 研究計画

### Study-I (HLA適合非血縁移植)

#### 2) 組織適合性解析

1. 解析SNP候補の選定(約50多型)
2. 既存解析データの収集
2. 遺伝子多型解析の試料の収集、実施:  
愛知県がんセンター研究所、東海大学、東京都赤十字血液センター、東京大学、等班員施設

#### 3) 統計解析

1. 臨床データ、HLA型、HLAハプロタイプを cofounderとする多変量解析による急性GVHD(primary endpoint)、慢性GVHD、白血病再発、非再発死亡及び全生存のリスク分析。

## 研究計画

### Study-II (HLA不適合移植)

ミスマッチHLA座と上記1で有意となった遺伝子多型との影響度の比較

#### 1) 症例・試料

Study-Iの1, 3, 5を満たすHLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1の1座不適合

症例: 各座不適合200症例以上

#### 2) 組織適合性解析

1. Study-Iで選定される遺伝子多型解析。

#### 3) 統計解析

不適合HLA座・型(組み合わせ)とHLA以外の多型との移植免疫反応への影響度の比較。

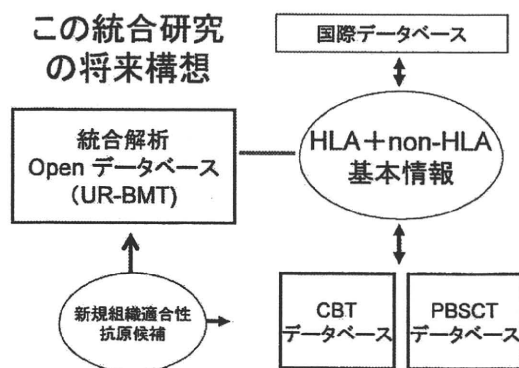
## 遺伝子多型(1)

| Gene/Alias                                | Investigator (JMDF) or Paper |
|---|------------------------------|
| <b>A: HLA</b>                             |                              |
| HLA locus (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1) |                              |
| HLA-E, F                                  |                              |
| HLA haplotype                             | Morishima S                  |
| HLA mismatch combination                  | Kawase                       |
| HLA epitope                               | Kawase                       |
| <b>B: non-HLA in HLA region</b>           |                              |
| MICA/MICB etc.                            |                              |
| TNF                                       | Ishikawa Chris               |
| <b>C: NK cell receptor and ligand</b>     |                              |
| KIR2DL                                    | Yabe                         |
| KIR3DL/S1                                 | Blood:115,3161,2010          |
| KIR2DS                                    | Yabe                         |
| NKG2D                                     | Takami                       |
| LILRB2                                    | Yabe                         |

## 遺伝子多型(2)

|  |                            |
|--|----------------------------|
| <b>D: polymorphic genes in non-HLA region</b>                                |                            |
| multi-SNPs<br>rs7447336; rs17473423 et al.                                   | Ogawa, Matsubara           |
| Microsatellite<br>DXS0629; D6S0035; D17S0219; TNF; DXS0324; D16S3082; et al. | Lee, Kikuchi, Chris        |
| mt0chord/cDNA  | Ishikawa                   |
| <b>D-1: minor HLA</b>  |                            |
| UGT2B17  | Murata, Terakura           |
| Other common gene deletion polym   | Nat Genetics: 41:1341,2009 |
| HA-1 etc   |                            |
| ACC-1 etc  | Akatsuka, Nizida           |
| <b>D-2: cytokine and receptor gene etc.</b>                                  |                            |
| Toll-like receptor 4/7   | Blood 115:1865,2010        |
| NOD2/CARD15  | Tanabe T                   |
| IL-2   | Chris                      |
| IL-10 /R   | Yabe, Chris, Saji          |
| IL-23R   |                            |
| IL-17  | Takami                     |
| CCR5   | Blood 115:2911,2010        |
| CCR7   | Blood on line              |
| CCR8   | Murata                     |
| CTLA-4   | Chris, Murata              |

## この統合研究の将来構想



## Multi-SNP 解析による日本人 HLA ハプロタイプの均一性の検討

森島聡子<sup>1)</sup>、小川誠司<sup>2)</sup>、松原亜以子<sup>2)</sup>、柏瀬貢一<sup>3)</sup>、笹月健彦<sup>4)</sup>、森島泰雄<sup>1)</sup>

1) 愛知県がんセンター中央病院 血液細胞療法部

2) 東大医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト

3) 東京都赤十字血液センター検査部

4) 九州大学生体防御医学研究所

### 【背景・目的】

我々は日本人に頻度の高い3つの HLA ハプロタイプ HP-P1 (HLA-A\*2402 -Cw\*1202 -B\*5201 -DRB1\*1502 -DQB1\*0601 -DPB1\*0901), HP-P2 (HLA-A\*3303 -Cw\*1403 -B\*4403 -DRB1\*1302 -DQB1\*0604 -DPB1\*0401), HP-P3 (HLA-A\*2402 -Cw\*0702 -B\*0702 -DRB1\*0101 -DQB1\*0604 -DPB1\*0402) が非血縁者間において HLA アリル以外の領域も含めて高度に保存されていること、またその HLA ハプロタイプに由来する遺伝的背景因子が急性 GVHD の発症と関係する可能性のあることを報告した (*Blood*.2010;115(23):4664-4670)。今回、それ以外の HLA 型に基づく日本人の HLA ハプロタイプが、HLA 座以外の領域も含めてどの程度保存されているかを、JMDP 非血縁移植 (UR-BMT) の HLA 型と multi-SNP データを用いて検討した。

### 【方法】

JMDP を介して移植が行われた患者・ドナー1800 ペア(3600 検体) で Affymetrix 500K array での SNP タイピングを行い、HapMap PhaseII データに基づいて未観測 SNP を impute した後、約 3.6Mb の HLA 領域 7200 SNP について解析した。最初に、homozygous HP-P1, P2, P3 で各 HP の SNP のコンセンサス配列を決定した。その配列を基に、片方に HP-P1, P2, P3 を持つ個人でもう一方の HLA-HP の HLA-A から DQB1 までの SNP 配列を決定し、各 HP を有する個人集団別にその保存性を解析した。

### 【結果】

HP-P1, P2, P3 の SNP のコンセンサス配列を 99.5%以上連続性に有し、もう片方に別の HLA-HP を持つ個人は 1702 例認め、440 種類の HLA-HP に分類できた。そのうち 10 例以上存在する 39 種類の HLA-HP について HLA-A から DQB1 までの SNP の均一性を検討したところ、90%以上の個人が同一の SNP 配列を連続性に有する HP や、異なる SNP 配列を有した二つ以上の subtype に分かれるものなど均一性の度合いは HP により異なっていた。

### 【まとめと考察】

JMDP の非血縁者間のデータを用いて、400 種類以上の日本人 HLA-HP における SNP 配列を決定できた。各 HLA-HP の均一性の違いは、UR-BMT においては HLA ハプロタイプに由来する遺伝的背景因子の違いのみならず、ドナーと患者の HP の一致性の差とも関係し、GVHD などの臨床成績に影響する可能性もあり、その解析を進めている。

# 日本人の MICA アリル頻度および HLA-B 座・DR 座の連鎖不平衡について

楠木靖史、丸屋悦子、佐治博夫  
特定非営利活動法人 HLA 研究所

## 【はじめに】

MICA 抗体は HLA 抗体と同様に臓器移植時の拒絶に関する重要な non-HLA 抗体のひとつと考えられている。テラサキらにより、移植患者のうち約 10%が MICA/B 抗体を有しており、HLA 抗体保有患者と同様、生着率が悪いことが報告されている。造血幹細胞移植においても MICA genotype と MICA 抗体が chronic GVHD と相関することが報告されている(文献)。我々は、日本人における MICA アリル頻度と HLA-B 座・DR 座との連鎖不平衡についてのデータベース作りを目指し、123 家系について HLA と MICA のアリル型を検査した。現在使用可能な MICA アリルタイピングキットではアリル判定に ambiguity が多く出るが、家族検体の利点を利用し ambiguity の絞り込みを行い、膜表面上の抗原を形成するアミノ酸の変異に関するアリルの分類を行った。

## 【材料・方法】

- ・ 造血幹細胞移植のドナー検索を目的とした HLA タイピング家系：123 家系、480 人、491 ハプロタイプ
- ・ HLA/MICA タイピング方法：Luminex 法 (WAK Flow/Lab Type)

## 【結果・考察】

日本人で 1%以上の頻度を示す MICA アリル頻度を以下に示す。

### MICA allele frequency in Japanese population

| MICA                 | n  | 頻度 (%) |
|----------------------|----|--------|
| MICA*009:01          | 88 | 17.92  |
| MICA*010/054         | 75 | 15.27  |
| MICA*012:01          | 64 | 13.04  |
| MICA*002:01          | 62 | 12.63  |
| MICA*008:01          | 62 | 12.63  |
| MICA*027             | 62 | 12.63  |
| MICA*040             | 32 | 6.52   |
| def                  | 13 | 2.65   |
| MICA*045             | 10 | 2.04   |
| MICA*016/019/056     | 8  | 1.63   |
| MICA*016/019/033/056 | 6  | 1.22   |

### 日本人の HLA-B-MICA-DR haplotype (頻度 2%以上)

B\*5201-MICA\*009:01-DRB1\*1502  
B\*4403-MICA\*040-DRB1\*1302  
B\*0702-MICA\*008:01-DRB1\*0101  
B\*4601-MICA\*010/054-DRB1\*0803,  
B\*4006-MICA\*027-DRB1\*0901  
B\*3501-MICA\*002:01-DRB1\*0901  
B\*5901-MICA\*012:01-DRB1\*0405

従来報告された HLA-B と MICA の連鎖が確認されたものと、新たな連鎖が発見された MICA および連鎖が異なった MICA アリルがあった。造血幹細胞移植における MICA 抗体の意義を研究するとき、MICA 抗体が DSA であるかの確認にも今後 MICA のアリル型タイピングが重要と考えられる。今後、日本人に多い頻度の MICA のアリルの ambiguity を解消するための簡便な検査法を確立したい。

【参考文献】 Boukouaci W, et al. MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. Blood. 2009 Dec 10;114(25):5216-24.

## 「HapMap リソースを用いた SNP 同定ソフトウェアのオンライン公開」

赤塚美樹<sup>1,2</sup>、山村武史<sup>2</sup>、松原亜以子<sup>3</sup>、小川誠司<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 藤田保健衛生大学血液内科、<sup>2</sup> 愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部、

<sup>3</sup> 東京大学医学部付属病院がんゲノム他)

### 【目的】

HLA 一致同種造血幹細胞移植後にドナー由来 T 細胞が認識するアロ抗原は全てマイナー組織適合抗原 (マイナー抗原) である。それは移植後高頻度に患者細胞のみを選択的に認識する T 細胞が患者末梢血に存在することからも明らかである。こうした T 細胞をクローン化することで、個々のクローンが認識するマイナー抗原の形成をコントロールする遺伝子多型 (多くは SNP) を決定し、T 細胞エピトープを同定しうる。この中で有望なものが養子免疫療法やワクチン療法の候補となっている。

我々はこれまでに種々の遺伝子同定法を新規に開発し、抗原を決定してきた。それらのうち、HapMap 計画で収集された B-LCL とそのゲノムデータを活用する方法は汎用性が広い。今回、我々が開発・検証してきた解析ソフトウェアをインターネットで公開する準備が整いつつあるので紹介したい。

### 【従来の方と今回の改良】

ソフトウェアは東大血液内科グループで開発され、実際に 3 種類の CTL クローンについて標的抗原遺伝子の同定を試み、全てについて同定に成功した。これまでは CTL アッセイの結果で、HapMap 計画に登録された B-LCL パネルの各 CTL クローンに対する感受性を陰性・陽性と判定し、その結果をもとに各 B-LCL を陽性群・陰性群に分けて、テキストファイルに毎回書き直して Macintosh のコマンドモードで計算するしか方法がなかった。

そこで今回インターネット上での公開を目標に本計算ソフトの interactive なインターフェースを作成し、画面で各 HapMap B-LCL の表現型 (CTL であれば傷害活性あり・なし) をプルダウンメニューで選択し計算開始ボタンをクリックするだけで相関の高い SNP からゲノムワイド P 値とともに結果を画面上に表示するシステムを構築した。

### 【新規抗原遺伝子同定の事例】

Fred Hutchinson 癌研究所から遺伝子同定の依頼のあった HLA-B7 拘束性の CTL クローン (K9.3) を用いてシステムの検証を行った。初期情報では白人由来 B-LCL におけるマイナー抗原陽性頻度は 52% であったため、60 種の B-LCL からなる CEU パネルの B-LCL の検討のみで十分な統計学的パワ

一が得られると予測された。さらに K9.3 は抗原特異的に大量の interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を産生したため煩雑な  $^{51}\text{Cr}$  遊離試験を行う必要がなかった。K9.3 の IFN- $\gamma$  産生を刺激した B-LCL は 26、刺激しなかったのは 28、判定不能は 3 で、抗原陽性率は 48% であった。Web 画面に表示される各 HapMap B-LCL 名のプルダウンメニューで抗原判定結果を入力し permutation=100 で計算したところ、第 2 番染色体上の rs1124649、rs6721395、rs11681145 の 3 つの SNP が同等の相関 ( $\chi^2$  乗値で 45.1023) を示した。ここには *TMEM214* と *AGBL5* の 2 遺伝子が存在していたが、さらに別の B-LCL セットで SNP タイピングと細胞傷害性試験結果を比較したところ、rs1124649 がマイナー抗原を決定する SNP であり、この SNP を含む領域に存在する *TMEM214* 遺伝子産物上に 9 個からなるペプチド (YPRLKMLAF) が K9.3 のエピートープとして同定された。

#### 【考察】

今回はマイナー抗原の同定目的で HapMap データを利用したが、各 B-LCL を他の readout で分ける方法 (たとえば薬剤耐性など) を確立すれば、このソフトウェアは原因 SNP の迅速同定に寄与すると考えられた。今後さらに JPT と CHB の入力ページを追加し、このソフトウェアをインターネット上に公開する予定である。

#### 【謝辞】

本研究は厚生労働科学研究からの研究助成金の他、日本学術振興会の基盤 C の研究費で実施された。

同種造血幹細胞移植後合併症と遺伝子多型解析—非血縁者間骨髄移植症例のマイクロサテライト多型解析と HLA 一致の同胞間移植における移植後肺合併症疾患関連遺伝子の報告

1,3, Christian Harkensee、2, 鬼塚真仁、1, 岡晃、1, 猪子英俊、2, 安藤潔、4, 宮村耕一

1 : 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

2 : 東海大学医学部内科学系血液腫瘍内科

3 : Newcastle University

4 : 名古屋第一赤十字病院血液内科

非血縁者間骨髄移植症例のマイクロサテライト多型解析

当施設では、Christian Harkensee 氏を中心に、非血縁者間骨髄移植症例における急性 GVHD 疾患関連遺伝子の探索にマイクロサテライト多型を用い解析を行ってきた。解析の手法は第一段階として急性 GVHD II-IV 群と GVHD 非発症群の Genomic DNA を均等に混ぜ (pool DNA)、500 以上の候補遺伝子を対象にし、各遺伝子に 2~3 のマイクロサテライト多型を選択し多型解析を行った。第二段階の解析として、第一段階で得られた候補遺伝子に対して、個々の症例を対象とするマイクロサテライト多型解析を行った (individual DNA)。前回班会議では、第二段階の解析までにおいて 5 つの候補遺伝子が得られていることを報告しているが、今回、第二段階の解析によりあらたな 7 つの疾患関連候補遺伝子が得られたことを報告する。

HLA 一致同胞間移植における移植後肺合併症疾患関連遺伝子の報告

HLA 一致同胞間移植症例は、次の 2 点で非血縁者間骨髄移植症例を対象とする疾患関連遺伝子多型解と異なる。すなわち、1) HLA の影響を考慮しなくても良い、2) 詳細な臨床データが得られるといった点であるが、反面、high dimension な多型解析では症例数が限られていることから、統計学的に十分な power を有しない点が大きな問題である。

今回、Chien JW らの報告から<sup>1</sup>、移植後肺合併症発症と *BPI* (bactericidal/permeability-increasing protein) 遺伝子多型性について、本邦での HLA 一致同胞間移植症例について検討した。HapMap リソースから日本人における *BPI* 多型を選択し、ヘテロ接合度を検討し 4 つの SNP を選択し肺合併症発症例と非発症例において比較検討した。rs5743530 において疾患群と非疾患群間に多型頻度に差を認めた (Table1)。

1. Chien JW, Zhao LP, Hansen JA, Fan WH, Parimon T, Clark JG. Genetic variation in bactericidal/permeability-increasing protein influences the risk of developing rapid airflow decline after hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2006;107:2200-2207.

**Table 1 Allele Distribution of BPI polymorphisms**

|             | NIPD            |             | without NIPD    |             | P value    |        | Hazard Ratio (CI) |                  |
|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|------------|--------|-------------------|------------------|
|             | recipient n (%) | donor n (%) | recipient n (%) | donor n (%) | recipient† | donor‡ | recipient†        | donor‡           |
| rs5741798   |                 |             |                 |             |            |        |                   |                  |
| G           | 21 (52.5)       | 21 (52.5)   | 107 (53.0)      | 104 (51.5)  |            |        |                   |                  |
| C           | 19 (47.5)       | 19 (47.5)   | 95 (47.0)       | 98 (48.5)   | 1.00       | 1.00   | 0.98 (0.56-1.74)  | 1.04 (0.59-1.82) |
| rs1934917   |                 |             |                 |             |            |        |                   |                  |
| T           | 34 (85.0)       | 31 (77.5)   | 135 (66.8)      | 142 (70.3)  |            |        |                   |                  |
| A           | 6 (25.0)        | 9 (22.5)    | 67 (33.2)       | 60 (29.7)   | 0.024      | 0.44   | 2.45 (1.07-5.58)  | 1.37 (0.69-2.73) |
| rs5743530*  |                 |             |                 |             |            |        |                   |                  |
| C           | 29 (72.5)       | 27 (72.5)   | 104 (51.5)      | 98 (49.0)   |            |        |                   |                  |
| T           | 11 (27.5)       | 13 (32.5)   | 98 (48.5)       | 102 (51.0)  | 0.015      | 0.038  | 2.16 (1.13-4.12)  | 1.91 (1.0-3.52)  |
| rs2275954** |                 |             |                 |             |            |        |                   |                  |
| A           | 27 (67.5)       | 24 (70.6)   | 124 (61.4)      | 113 (55.9)  |            |        |                   |                  |
| G           | 13 (32.5)       | 10 (29.4)   | 78 (38.6)       | 89 (44.1)   | 0.59       | 0.13   | 1.25 (0.58-2.90)  | 1.73 (0.87-3.46) |

\*One without NIPD donors could not be typing.  
 \*\*Three NIPD donors could not be typing.  
 † Compared to NIPD recipient and without NIPD recipient.  
 ‡ Compared to NIPD donor and without NIPD donor.  
 CI indicates confidence interval.  
 P value was calculated by Fisher's exact test.

## 「NK細胞受容体、サイトカイン遺伝子多型および検体保存事業協力」

東京都赤十字血液センター

○屋部登志雄、平安恒幸、中本貴之、東史啓、峯元睦子、柏瀬貢一

### 1、NK細胞受容体とそのリガンド型適合性

これまで行ってきたHLA不適合移植におけるドナー活性化型KIR遺伝子型と移植成績との関連について2005年度までの非血縁者間骨髄移植症例検体で再現性の確認を行っている。またHLA適合症例におけるドナー及び患者の16種類のKIR型と成績との関連について検討している。急性GVHD重症化と関連することが報告されているマウスMHCクラスI抗原認識受容体PIR-Bのヒト相当分子のLILR受容体ファミリーと移植成績との関連解析を行い抑制型LILRB2遺伝子多型が急性GVHD重症化と関連する結果が得られた。また東京都赤十字血液センター臍帯血バンクの協力を得て、同バンク経由移植症例検体のNK細胞受容体及びリガンド型と移植成績との関連解析に着手している。

### 2、サイトカイン遺伝子多型

これまでに非血縁者間骨髄移植において、患者のIL-10遺伝子のプロモーター領域SNPハプロタイプが急性重症GVHD発症と関連することを報告した。今年度はそれらのSNPハプロタイプとIL-10発現量との関連について検討を行っている。東大小川グループの全ゲノム解析データを供与していただき、周辺領域のIL-10ファミリー遺伝子SNPと成績との関連を解析したところ、抑制性サイトカインIL-19遺伝子SNPが急性重症GVHD発症および無病生存率と関連することが判明した。そこでさらに検体数を増やして周辺領域SNPについて解析を行った結果、IL-10SNPとは独立した関連であることが明らかとなった。

### 3、検体保存事業協力

後方視野的研究のためにJMDPが収集、保存する患者/ドナー検体の血液から抽出されたDNAを用いてHLA-AからDPの6座を蛍光ビーズ法でアレルタイピングしており、昨年度は2007年度に保存された1588検体について行った。今年度は2008年度に保存された約2000検体を昨年と同様にHLAのタイピングを実施する予定である。また昨年度はDNAの全ゲノム増幅(WGA)系の構築と検証作業および検体セットをロボットシステムで作成、配布する系の構築を実施した。2008年度に保存された検体も同様、WGAを実施する予定である。さらに、確実・安全なサンプル管理を進めるため、過去にバーコード付加されていないチューブに保存されたDNA約1万本をバーコード付加チューブへ移し替えを実施する予定である。



# 造血幹細胞移植における NKG2D 遺伝子多型解析

金沢大学附属病院 高見昭良・Jルイス・エスピノーザ・中尾眞二

NKG2D は、遺伝子多型により、高 NK 活性型(NKG2D-HNK1)と低 NK 活性型(NKG2D-LNK1)がある(1)。HLA アリル一致非血縁者間骨髄破壊的前処置骨髄移植 145 症例を解析したところ、HNK1 ハプロタイプ陽性ドナーから移植を受けた患者(標準リスク群)の生存率(OS)・移植関連死亡(TRM)は有意に優れていた(図 1)(2)。この結果は第 2 コホート(360 例)解析でも確認された。そこで、移植免疫における NKG2D 遺伝子多型の影響を検討するため、NK 細胞の機能解析を行った。健常人の NK 細胞をエフェクターとして、CMV 感染線維芽細胞・NKG2D-L 誘導(VPA 処理)骨髄性白血病細胞株に対する細胞傷害活性を検討したところ、HNK1 陽性 NK 細胞は HNK1 陰性 NK 細胞に比べて、高い細胞傷害活性を示した(図 2・3)。活性化 NK 細胞上の NKG2D 発現は、HNK1 陽性の方が高く、mRNA 発現も同様であった。次に、NKG2D ハプロタイプを決定する SNP(rs1049174)が NKG2D 3'UTR 領域にあることを考慮し、NK 細胞内 NKG2D mRNA に対する影響をレポーター遺伝子解析で検討した。NKG2D アリル種類にかかわらず NKG2D 3'UTR 挿入後レポーター遺伝子発現は低下したが、LNK1 アリルの方が HNK1 アリルより、発現低下が顕著であった(図 4)。標識した NKG2D アリルプローブと核内抽出物との反応をゲルシフト解析でみたところ、LNK1 アリルの方が、核内抽出物と高い結合性を示した。以上から、NKG2D 3'UTR SNP(rs1049174)は機能的な SNP で、核内の抑制因子と結合することにより、NKG2D 遺伝子発現を調整している可能性が示唆された。これにより、NKG2D 遺伝子多型が、移植後転帰に影響していると考えられた。

1. T. Hayashi *et al.*, *Cancer Res* 66, 563 (Jan 1, 2006).
2. J. L. Espinoza *et al.*, *Haematologica* 94, 1427 (Oct, 2009).

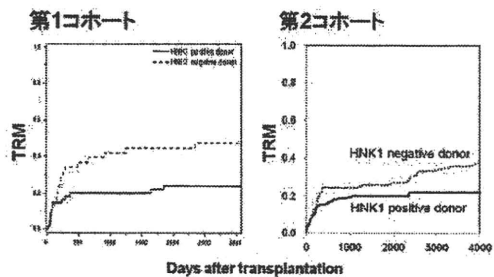


図1. HLAアリル一致非血縁者間移植後移植関連死亡(標準リスク群)

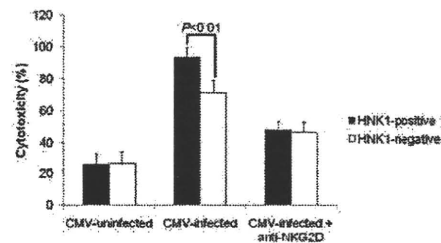


図2. CMV感染線維芽細胞に対するNK細胞傷害活性

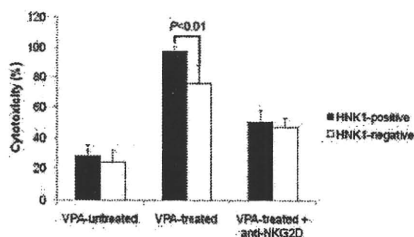


図3. 骨髄性白血病細胞株に対するNK細胞傷害活性

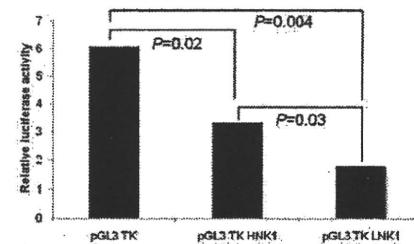


図4. レポーター遺伝子解析

佐治博夫、楠木靖史、丸屋悦子  
特定非営利活動法人 HLA 研究所

移植のロジスティック（兵站学的）問題とは、最良のドナーをレシピエントに提供するための戦術的問題であり、もともとは臓器移植において HLA 抗体を保有するレシピエントの待機時間を短縮する方策に端を発する。ときに直接クロスマッチのためのドナーリンパ球の採取・運搬などの困難性を解決する方法論を意味する。造血幹細胞移植においても HLA ミスマッチ移植が日常的に行われるようになり、ロジスティックス（兵站学的システム）が必要になった。輸血分野では待機手術に「タイプ & スクリーン」システムが導入されて久しい。移植はすべてが待機手術の範疇であり、相似のシステムを構築することでロジスティック問題を解決しようというのが「HLA タイプ & スクリーン」である。またの名をバーチャル・クロスマッチという。すでに受託検査として実施しているので報告する。

<背景> レシピエントがドナー特異的 HLA 抗体（DSA（donor specific antibody））を有しているとき、移植臓器は急性拒絶される。HLA ミスマッチ造血幹細胞移植においても DSA があるとき、拒絶のリスクは高くなる。高梨らによれば、臍帯血移植におけるリスクは 50% であり、ハプロ半合致移植でも 33~60% が拒絶される（未発表データ）。レシピエントがもつ HLA 抗体が Non-DSA であるときは拒絶率に影響しない。すなわち、ドナーリンパ球とレシピエント血清による直接クロスマッチが必須となってきた。しかしながら新鮮なドナーリンパ球をタイミングよく得ることは困難なことが多く、臍帯血移植においては不可能に近い。また、HLA 抗体保有のレシピエントに効率よく適合臍帯血を得るためのロジスティックスが必要になってきた。

<HLA タイプ> レシピエントの HLA-A,B,Cw,DR をタイプする。ドナーの HLA-A,B,Cw,DR をタイプするか、検索して HLA タイプを得る。双方を照合して、適合するドナーが得られるときクロスマッチは不要である。GVHD 方向適合で HVG 方向不適合、ハプロ半合致で HVG 方向不適合、臍帯血バンクからの HVG 方向不適合のときは、次の「HLA 抗体スクリーニング」を行う。

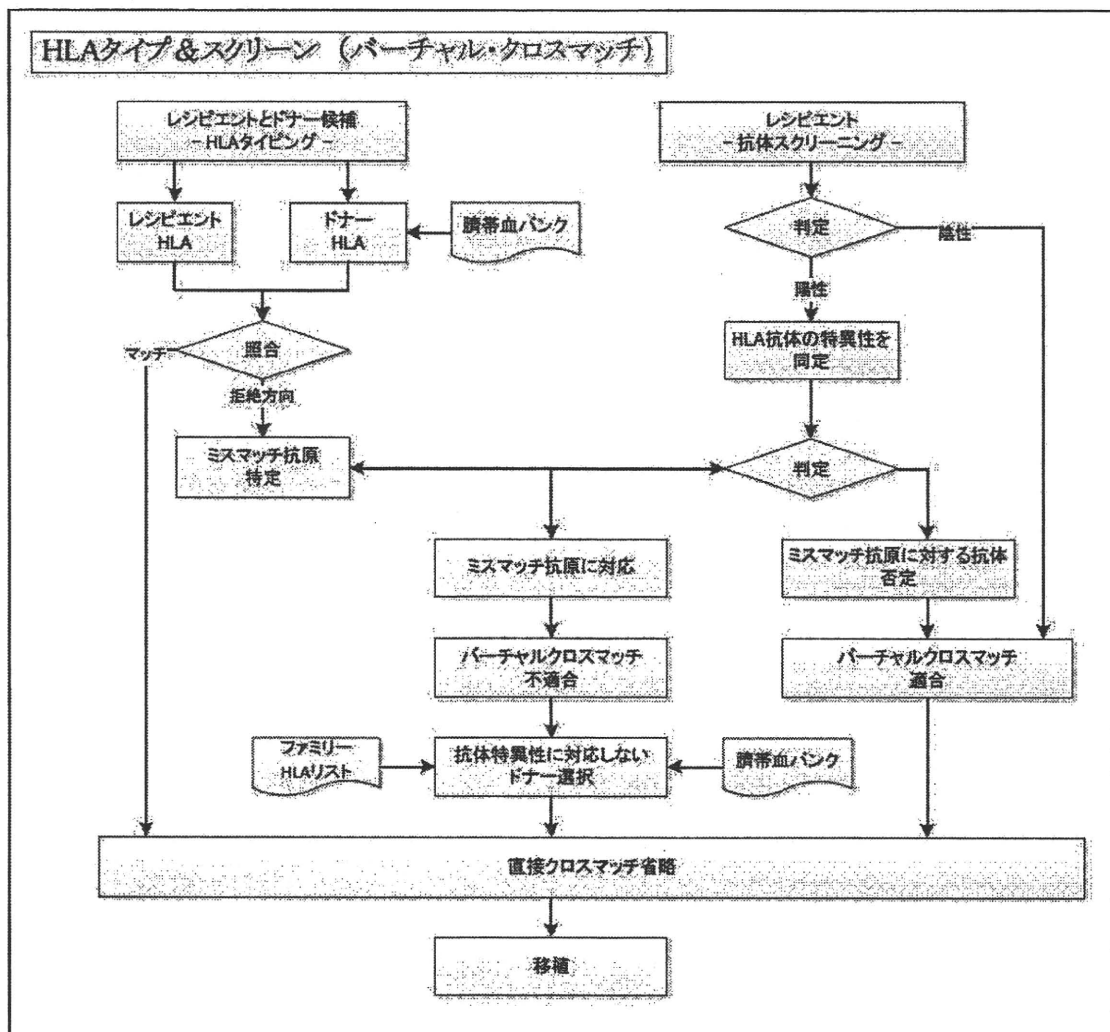
<スクリーン> レシピエントの血清（または血漿）を得て、HLA 抗体スクリーニング検査を Luminex 法で行う（LABScreen PRA、WAKFlow HLA 抗体）。抗体が検出されないときは、ドナーのミスマッチ HLA に対する抗体（DSA）が否定できること（当該 HLA がパネルに存在すること）を確認して、クロスマッチ陰性とみなす（バーチャル・クロスマッチ陰性）。抗体が陽性のときは、Single Antigen Coated Beads 法（LABScreen Single Antigen）で抗体の特異性を同定する。特異性が DSA であるときはバーチャル・クロスマッチ不適合とする。DSA を否定できるときはバーチャル・クロスマッチ適合と判断する。臍帯血バンクからの HLA ミスマッチ適合ドナーは、抗体の特異性に当たる抗原を回避して

選択することができ検索が容易になる。

<考察> HLA タイピング精度はほぼ完成の域にあり、レシピエントとドナーの HLA 照合により、ドナーのミスマッチ HLA (HVG 方向ミスマッチ HLA) を特定することは容易である。HLA 抗体検出法は Luminex 法の出現により、移植臨床に十分に耐えうる感度と精度と所要時間の短縮が得られるようになった。また、移植臨床には HLA 抗体と MICA 抗体が最重要であり、他の non-HLA 抗体の臨床意義はほとんどないことがわかってきた。HLA 抗体に特化した「HLA タイプ & スクリーン」を移植の臨床に導入するべきときと考える。

利点はドナーリンパ球がなくても適合試験ができロジスティクスに利することである。

問題点は Luminex 法の感度である。高感度であるがゆえに従来の方法では検出できなかったいわゆる「自然抗体」が検出される。自然抗体は non-allo HLA 抗体であり、ウイルスなどパラサイト抗体や、食物などに対する抗体が、HLA 抗原エピートプと交差反応する抗体である。臨床意義は不明のままであるが、低力価であることが多いので無視できる。当面 HLA タイプ&スクリーンは HLA 血清学の専門家による判定が必要である。



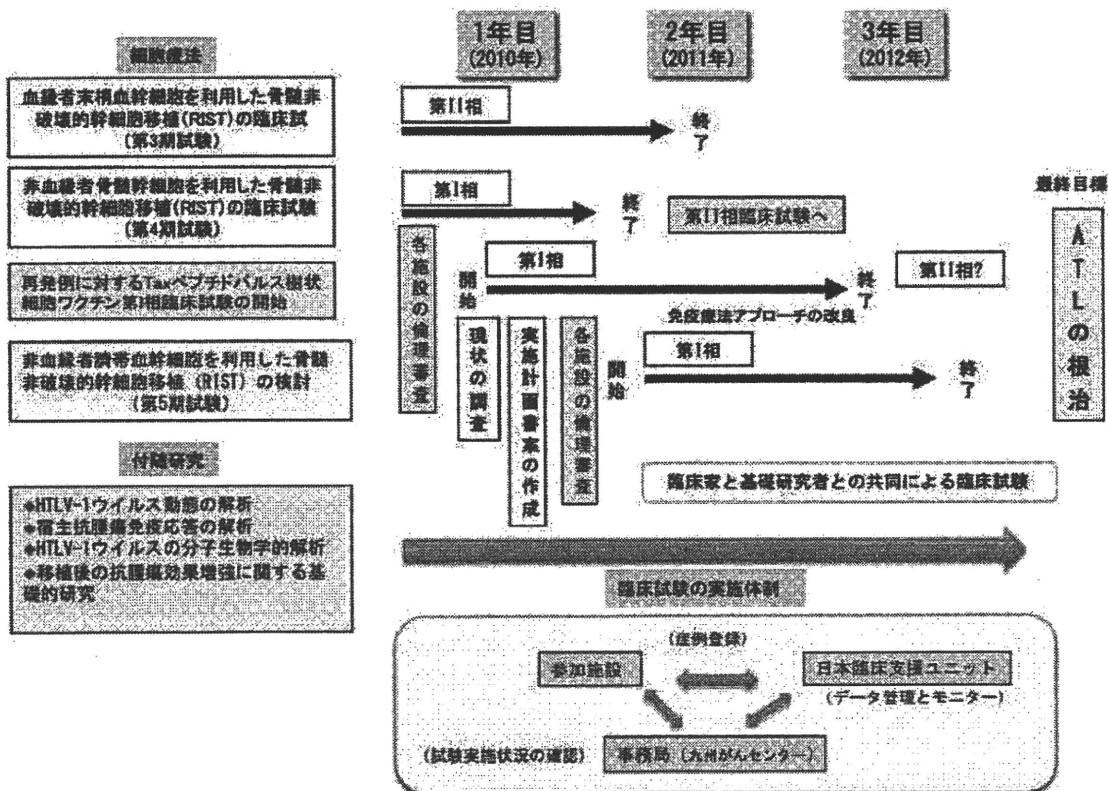
1. 成人 T 細胞白血病 (ATL) の根治を目指した細胞療法の確立およびその HTLV-1 抑制メカニズムの解明に関する研究の概説  
独立行政法人国立病院機構 九州がんセンター 血液内科 鵜池直邦
2. 同種造血幹細胞移植 多施設共同研究の進捗状況  
独立行政法人国立病院機構 九州がんセンター 血液内科 崔 日承
3. 北海道における成人 T 細胞性白血病/リンパ腫に対する同種造血幹細胞移植  
第 3 報  
北海道大学病院 造血細胞治療センター血液内科 白鳥聡一

「成人 T 細胞白血病 (ATL) の根治を目指した細胞療法の確立およびその HTLV-1 抑制メカニズムの解明に関する研究」

ATL は HTLV-1 感染から約 60 年を経て発症する稀な造血器腫瘍で 5 年生存率約 10%と予後不良である。50 才未満の患者に対して骨髄破壊的前処置を伴う従来型の同種幹細胞移植の有効性が示唆されているが、移植関連死亡率 (TRM) が 40-60%と高く、多くの ATL 患者へは実施不可能と考えられていた。前研究班 (岡村班) では、50 才以上の患者を対象に、血縁者末梢血を用いた骨髄非破壊的前処置による移植 (RIST) の第 I 相試験を実施した。その結果、TRM は 20% 台へ減少、34%が 4 年以上生存し、57%ではプロウイルス量が検出限界以下となった (*Blood* 2005, *BBMT* 2008)。また、RIST 後 HTLV-1tax を標的とする Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導されることを発見した (*Cancer Res* 2004, *J Virol* 2005)。この結果から生体内で HTLV-1 感染 ATL 細胞を排除する抗 HTLV 活性が作動し、RIST が有効な免疫療法および抗ウイルス療法としての意義を持つことが判明した。

本研究班 (鶴池班) では現在、RIST の血縁者末梢血による第 II 相試験と非血縁者骨髄による試験を実施中であり、2 年目までに終了する予定である。一方、骨髄バンクによる移植ではコーディネートに時間を要して移植までのタイミングが遅れ、待機中に再発する症例が多い現状をふまえ、幹細胞源を非血縁臍帯血へ拡大した試験を実施して、全患者の 10-20%しか移植を受けられない現状を打破することも考慮する。さらに早期再発に対する対策として、これまでの岡村班の重要な成果である HTLV-1 排除機構 (HTLV-1tax 特異的細胞障害性 T 細胞の誘導) を臨床応用することを目的とした HTLV-1tax を標的抗原とした樹状細胞を用いた免疫療法の第 I 相試験を初年度に開始に取り組む予定であり、将来的には ATL の根治を目指す研究班にすることが目標である。(下図参照下さい)

## 岡村班から鶴池班への流れ図



今回の合同班会議では、鶴池班の概説とともに班の臨床試験の進捗状況を発表し、さらに北海道地区におけるATLの移植療法（成績が良いことで注目されている）について北海道大学の白鳥聡一先生から発表していただく。

白鳥聡一, 在田幸太郎, 小杉瑞葉, 安本篤史, 杉田純一, 重松明男, 小野澤真弘, 遠藤知之, 近藤健, 西尾充史, 橋野聡, 田中淳司, 今村雅寛

札幌北楡病院

金谷穰, 桂有希, 小林直樹, 笠井正晴

成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (ATLL) の予後は依然として不良である。近年、ATLL に対する同種造血幹細胞移植の報告が増加しており、移植成績や治療法としての位置づけ等について詳細な検討が必要な状況である。我々はこれまでに北海道大学病院および札幌北楡病院における ATLL に対する同種造血幹細胞移植の報告を行ってきた。今回、観察期間を伸ばし、また新規症例を加えて解析した。

対象は 2000 年 10 月から 2010 年 4 月までに上記 2 病院で同種造血幹細胞移植を施行された ATLL 28 症例 (男性 13 例、女性 15 例) で、年齢の中央値は 57 歳 (37-66) であった。移植前病態は CR が 16 例、non CR が 12 例 (PR 8 例、PD 4 例) であり、移植前処置は 9 名が Conventional regimen、19 名が Reduced-intensity regimen で施行された。GVHD 予防は CsA+MTX が 15 例、FK+MTX が 13 例であった。好中球の生着は 27 例 (96.3%) で得られた。急性 GVHD は 66.8% で認められ、その内、Grade 2-4 が 84% を占めた。一方慢性 GVHD は、評価可能な症例中 87.0% において認められた。3 年の Overall survival (OS) および Progression free survival (PFS) は、それぞれ 53.2%、49.2% であった。今回、さらに OS および PFS に関与した因子を解析し報告する。

7月4日(日)

午前

メインホール



厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業  
「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班  
平成 22 年度第 1 回班会議プログラム

日時：平成 22 年 7 月 4 日（日）9 時 00 分～12 時 00 分

場所：愛知県がんセンター国際医学交流センター大ホール

9:00 研究代表者挨拶 加藤 俊一（東海大学医学部基盤診療学系）

<セッション 1：基礎的研究>

座長 安藤 潔

9:10 造血細胞移植後患者に対する抗麻疹 DC ワクチン—第 I 相臨床試験—

○熊本 忠史、東 英一（三重大学医学部・細胞移植療法部）

9:20 さい帯血造血幹細胞の生体内動態

○八幡 崇（東海大学医学部・基盤診療学系）、安藤 潔（同・内科学系）

<セッション 2：臍帯血採取、品質管理、解析法開発>

座長 高橋 聡

9:30 臍帯血採取法の改良に関する研究

○正岡 直樹（東京女子医科大学八千代医療センター・産婦人科）

9:40 胎盤還流による造血幹細胞採取の検討

○池田 裕一、磯山 恵一（昭和大学藤が丘病院小児科）

9:50 キメリズム解析／HLA-Flow 法による HLA ミスマッチ移植後早期の生着と白血病細胞の同時解析

○渡辺 信和、高橋 聡（東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター）

<セッション 3：基盤整備と臨床研究（1）>

座長 加藤 剛二

10:00 臍帯血バンクにおける移植データ管理と一元化

○長村 登紀子（東京大学医科学研究所セルプロセッシング・輸血部）

加藤 剛二（名古屋第一赤十字病院小児科）

10:10 小児臍帯血移植における CyA3 時間点滴静注による GVHD 予防法の確立

○平松 英文、足立 壮一（京都大学医学研究科人間健康科学、附属病院・小児科）

10:20-10:30 — ブレーク —

<セッション 4：臨床研究（2）>

座長 甲斐 俊朗

10:30 複数臍帯血移植臨床試験 データ管理進捗状況の報告

○熱田 由子（名古屋大学造血細胞移植情報管理・生物統計学）

10:40 複数臍帯血移植（臨床第 II 相試験）—有害事象報告—

○甲斐 俊朗（兵庫医科大学・輸血部）

<セッション 5：臨床研究（3）>

座長 谷口 修一

11:00 東大医科研の方法による成人臍帯血移植の多施設第 II 相臨床試験—進捗状況—

○田野崎 隆二（国立がん研究センター中央病院 病理科・臨床検査科）

11:10 高齢者臍帯血移植におけるリンパ球回復カイネティクスの検討

○内田 直之、谷口 修一（虎の門病院血液内科）

11:20 臍帯血移植後の免疫能評価と免疫学的再構築促進手段について

○森尾 友宏（東京医科歯科大学医学部発生発達病態学分野）

<セッション 6：臨床研究（4）>

座長 小川 啓恭

11:30 当科における「骨髄内臍帯血ミニ移植」臨床 I 相試験結果

○岡田 昌也、吉原 哲、池亀 和博、甲斐 俊朗、小川 啓恭  
（兵庫医科大学・血液内科、輸血部）

11:40 臍帯血移植後に発症する臍帯血由来白血病の遺伝子解析

○坂下 一夫、松田 和之、小池 健一  
（信州大学医学部小児科、臨床検査部）

平成22年度  
厚生労働科学研究費補助金  
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

### 臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究

研究代表者  
加藤 俊一  
(東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学)

### 研究班2期目の目標と計画(1)

臍帯血バンクに関する検討

1. 臍帯血の採取方法の検討 (正岡直樹)
  - ・臍帯血採取バッグの改良(ニプロと共同開発)
2. 臍帯血の品質管理方法の検討 (高梨美乃子)
  - ・HLA抗体と生着の関係
  - ・HLA-C抗原と白血病再発・生存との関係
3. GMP基準での細胞処理の経費試算 (河原和夫)

基礎的検討から臨床応用へ

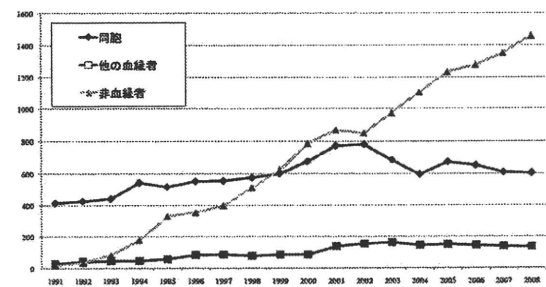
4. 臍帯血の骨髄内移植法の開発 (安藤 潔)
  - ・臨床研究の開始 (小川啓恭)
5. 麻疹DCワクチンの開発 (東 英一)
  - ・臨床研究の開始

### 研究班2期目の目標と計画(2)

臨床研究

6. 小児における前処置の至適化 (磯山恵一)
7. 小児におけるGVHD予防法の至適化(足立壮一)
8. 成人におけるCSTの前方視研究 (田野崎隆二)
9. 高齢者におけるRISTの前方視研究 (谷口修一)
10. 複数臍帯血移植 (甲斐俊朗)
11. 精緻なキメリズム評価法の開発 (高橋 聡)
12. 臍帯血移植におけるDLIの開発 (森尾友宏)
13. 真菌、ウイルス感染症の予防の検討 (加藤剛二)
14. 臨床研究サポートシステムの整備 (熱田由子)
15. 臍帯血移植データベースの確立 (長村登紀子)
16. 臍帯血由来細胞の白血病化 (小池健一)

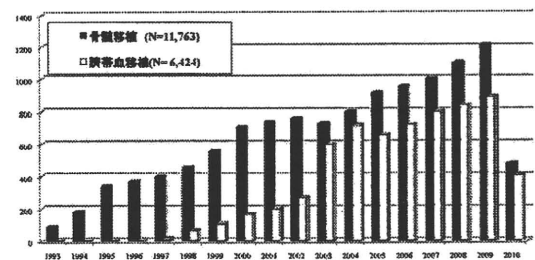
### 同種造血細胞移植(初回移植)ドナー別推移(JSHCT 1991-2008)



### 造血細胞移植の国内外の状況

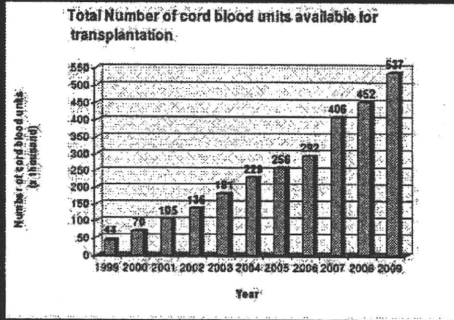
- ・わが国における造血細胞移植の現況
- ・非血縁者間骨髄移植と臍帯血移植の推移
- ・世界の臍帯血保存数の推移
- ・大陸別保存数
- ・年次別臍帯血供給数の推移
- ・年次別複数臍帯血移植供給数の推移
- ・臍帯血移植におけるHLA適合数(小児)
- ・臍帯血移植におけるHLA適合数(成人)

### わが国における非血縁者間骨髄移植と臍帯血移植の推移



2010年5月31日現在

Number of cord blood units available for unrelated transplantation on 31-12-2009



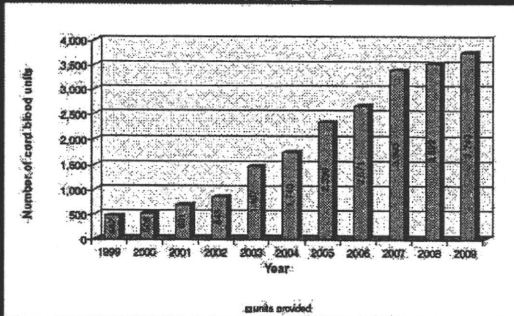
UNRELATED CORD BLOOD BANKS/REGISTRIES 2009

How many units are stored in each continent?



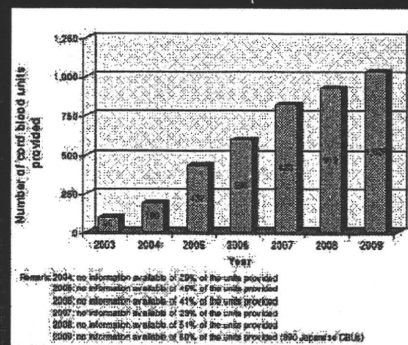
UNRELATED CORD BLOOD BANKS/REGISTRIES 2009

TOTAL NUMBER OF CORD BLOOD UNITS PROVIDED



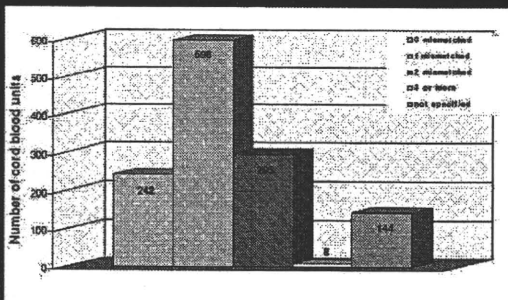
UNRELATED CORD BLOOD BANKS/REGISTRIES 2009

Number of cord blood units provided for multi cord transplantation



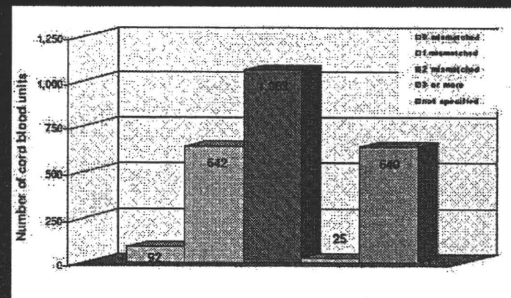
UNRELATED CORD BLOOD BANKS/REGISTRIES 2009

Degree of matching of the cord blood units provided for children (N=1,287)



UNRELATED CORD BLOOD BANKS/REGISTRIES 2009

Degree of matching of the cord blood units provided for adults (N=2,462)



UNRELATED CORD BLOOD BANKS/REGISTRIES 2009

## 造血細胞移植患者に対する 抗麻疹DCワクチンの第I相臨床試験

分担研究 「DCワクチンを用いた臍帯血移植後のウイルス感染予防法の開発に関する研究」

三重大学小児科・細胞移植療法部  
熊本忠史、伊藤美津江、岩本彰太郎、  
平山雅浩、東 英一

### 対象と投与方法

- 自家あるいは同種造血細胞移植後2年未満の患者。
- 移植後2年以上であっても免疫抑制剤を投与中、など通常の麻疹生ワクチン接種が困難と考えられる患者。
- 投与方法
  - 接種部位と回数：上腕あるいは大腿の皮下に1回接種
  - 1回当たりの接種細胞数：
    - ・コホート1 2x10<sup>5</sup> 3例
    - ・コホート2 1x10<sup>6</sup> 3例
    - ・コホート3 5x10<sup>6</sup> 3例

### 安全性

- 5例すべてにおいて接種後24時間以内の有害事象の発生なし。



- 5例において接種後6週以内の有害事象の発生なし。
- 5例すべてのDCワクチンの細菌・真菌PCR陰性、エンドトキシン陰性

### 目的とエンドポイント

- 目的：造血細胞移植後で既存のワクチン接種が困難な時期に、免疫抑制を惹起しない安全な麻疹DCワクチンを接種することにより、移植後に罹患すると致死率が高い麻疹の感染予防を行う。
- エンドポイント：
  - プライマリーエンドポイント：
    - ・安全性の確認
  - セカンダリーエンドポイント：
    - ・麻疹抗体価の上昇
    - ・麻疹特異的B細胞の増加
    - ・ワクチン接種至適時期の設定

### 対象症例とDCワクチン投与細胞数

| 症例 | 診断         | 移植後 | ドナー         | 慢性GVHD | 免疫抑制剤 | DCワクチン投与細胞数          |
|----|------------|-----|-------------|--------|-------|----------------------|
| 1  | Infant-ALL | 15M | Unrelate BM | -      | -     | 2 x 10 <sup>5</sup>  |
| 2  | T-ALL      | 27M | Double CB   | -      | -     | 2 x 10 <sup>5</sup>  |
| 3  | NB         | 29M | Auto BM     | -      | -     | 2 x 10 <sup>5</sup>  |
| 4  | AA         | 12M | Unrelate BM | -      | FK506 | 10 x 10 <sup>5</sup> |
| 5  | Ph1-ALL    | 14M | Unrelate BM | -      | -     | 10 x 10 <sup>5</sup> |
| 6  | AML        | 15M | Unrelate CB | -      | -     | 6月17日                |
| 7  | AML        | 10Y | Relate BM   | +      | FK506 | 6月18日                |
| 8  | Infant-ALL | 6M  | Unrelate BM | -      | -     | 7月1日                 |
| 9  | AA         |     | Relate BM   | -      | -     | 説明済                  |

### 血清麻疹抗体価

| 症例 | コホート | HI  |     | ELISA |      |        |
|----|------|-----|-----|-------|------|--------|
|    |      | Pre | 6週後 | Pre   | 6週後  | 4-12月後 |
| 1  | 1    | <8  | <8  | <2.0  | 3.2  | 3.9    |
| 2  | 1    | <8  | <8  | <2.0  | 2    | <2.0   |
| 3  | 1    | <8  | <8  | <2.0  | <2.0 | <2.0   |
| 4  | 2    | <8  | <8  | <2.0  | 3.1  |        |
| 5  | 2    | <8  | <8  | <2.0  | 2.4  |        |
| 6  | 2    |     |     |       |      |        |
| 7  | 3    |     |     |       |      |        |
| 8  | 3    |     |     |       |      |        |
| 9  | 3    |     |     |       |      |        |